

THESIS

MARBURG

1965

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

**Versuche
zur Trennung und Farbstoffmarkierung
von Polysaccharidantigenen
aus *Candida albicans* und *tropicalis***

KANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

**in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn**

vorgelegt von

Hans-Jürgen Zabel

aus Dessau/Sa. Anhalt

Marburg 1965

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Versuche
zur Trennung und Farbstoffmarkierung
von Polysaccharidantigenen
aus *Candida albicans* und *tropicalis*

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Hans-Jürgen Zabel

aus Dessau/Sa. Anhalt

Marburg 1965

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg / Lahn am 30.11.1965
gedruckt mit der Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. O. Braun-Falco
Referent: Prof. Dr. med. R. Siegert,
Hygiene-Institut der Universität
Correferent: Priv.-Doz. Dr. med. W. Schiff,
Hygiene-Institut der Universität

Meiner Mutter
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Material und Methoden</u>	2
1. Farbstoffe	2
2. Hefestämme	2
3. Gewinnung der Polysaccharidantigene	2
a) Trennung von Zellwand und Zell-	
inhalt	2
b) Phenol/Wasserextraktion	2
4. Die Hydrolyse der Polysaccharide	3
5. Dünnschichtchromatographie	3
6. Seroreaktionen	4
a) Komplementbindungsreaktion	4
b) Präzipitation	4
C. <u>Ergebnisse</u>	5
1. Nachweis der Polysaccharide mittels	
Dünnschichtchromatographie	5
2. Auswahl der Farbstoffe am Modell	7
3. Bedingungen der Farbstoffmarkierung	
von Polysacchariden am Modell der	
Stärke	8
4. Serologische Versuche mit markier-	
ten Polysacchariden	13
a) Präzipitationsversuche	13
b) Komplementbindungsreaktion	15
D. <u>Besprechung</u>	16
E. <u>Zusammenfassung</u>	18
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	19

A. Einleitung

Über die antigenen Eigenschaften von *Candida albicans* und *Candida tropicalis* bestehen unterschiedliche Auffassungen.

Den Angaben von ALMON und STOVALL (1), KEMP und SOLOTOROWSKY (11) sowie SEELIGER (22) und älteren Berichten von TSUCHIYA (26), daß beide Hefen in ihrer Antigenstruktur völlig übereinstimmen, stehen Untersuchungen von MARTIN (15), POSPISIL (19) und neuere Arbeiten von TSUCHIYA (27) entgegen, die außer gemeinsamen auch unterschiedliche Antigene feststellten. Während die genannten Autoren die Eigenschaften bei intakten Zellen prüften, haben SIEGERT, MÜLLER und PACHALY (23) die Zellmembranen und den Zellinhalt beider Hefen getrennt untersucht. Wenn bei diesem Vorgehen ebenfalls keine Antigendifferenzen gefunden wurden, so kann das daran liegen, daß gemeinsame Antigene die spezifischen Antigene, die möglicherweise nach Zahl und Stärke unterlegen sind, überdecken. Diese Vermutung auszuschließen oder zu beweisen ist erst dann möglich, wenn es gelingt, die einzelnen Antigene serologisch und chemisch voneinander zu trennen und zu identifizieren.

Nach Angaben mehrerer Autoren (29, 20, 28, 13, 22, 25, 17, 12) handelt es sich bei den spezifischen Pilzantigenen allgemein um Polysaccharide. Für die Extraktion der serologisch aktiven Polysaccharide aus Hefen stehen mehrere Methoden, z.B. nach KESSLER und NICKERSON (13), JONSEN (10) sowie WESTPHAL (31) zur Verfügung. Die Isolierung der einzelnen Polysaccharid-Antigene bereitet dagegen noch Schwierigkeiten, vermutlich deshalb, weil Polysaccharide bei chromatographischen Auftrennungen, z.B. an Sephadex-Säulen, schwer auffindbar sind. Bisher gelang es nur, serologisch aktive Polysaccharide durch Prüfung jeder einzelnen Fraktion mit serologischen Verfahren nachzuweisen. Nach einer neueren Mitteilung von BÜRGER und MÜLLER (5) kann das Auffinden von Polysacchariden durch Markierung mit Vinylsulfonfarbstoffen erheblich erleichtert werden.

In der vorliegenden Arbeit soll mittels Dünnschichtchromatographie die Bestätigung erfolgen, daß es sich bei den serologisch aktiven Substanzen, die nach der Methode von WESTPHAL (31) gewonnen wurden, um Polysaccharide handelt. Ferner sollen die Eignung zweier Farbstoffe zur Markierung serologisch aktiver Polysaccharide geprüft und die schonendsten Bedingungen der Markierung ermittelt werden.

B. Material und Methoden

1. Farbstoffe:

Zur Färbung wurden folgende Vinylsulfonfarbstoffe* auf ihre Eignung, Polysaccharidantigene anzufärben, untersucht:

- a) Remazolrot B
- b) Remazoltürkisblau G

2. Hefestämme:

Die verwendeten Hefestämme stammten von dem Centralbureau voor Schimmelkulturs in Delft und trugen die Bezeichnung: *Candida albicans* CBS 256 (Robin) Berkhout, *Candida tropicalis* CBS 94 (Castellani) Berkhout.

Die Stämme wurden auf Sabouraud-Maltose-Agar (Difco) überimpft und jeweils 48 h bei 30 ° C bebrütet.

3. Gewinnung der Polysaccharidantigene:

a) Trennung von Zellwand und Zellinhalt

Die in 0,85%iger NaCl-Lösung gewaschenen Zellen sind in einer 50vol%igen Suspension 45 Min. mit Glaskugeln von 0,5 mm Durchmesser in der Vibrogenmühle (Fa. Bühler, Tübingen) bei ca. 3000 UpM homogenisiert worden. Der aus den geplatzten Zellen ausgetretene Inhalt wurde nach Zentrifugieren mit dem Überstand abgehoben. Die sedimentierten Hüllen sind solange ausgewaschen worden, bis die mikroskopische Kontrolle weitgehende Reinheit ergab.

b) Phenol/Wasser-Extraktion

Nach der Methode von WESTPHAL und Mitarbeitern (31) wurden ca. 100 mg (Trockengewicht) Membranen bzw. Zellinhalt in 40 ml Aqua dest. auf 68 ° C vorgewärmt, mit 40 ml 90%igem Phenol 30 Min. bei 68 ° C im Wasserbad geschüttelt und dann 15 Min. mit Eiswasser gekühlt. Anschließend ist der Ansatz 10 Min. bei ca. 2500 UpM zentrifugiert (Zentrifuge Typ UJ 3, Fa. Martin Christ, Osterode / Harz), die wäßrige Phase abgehoben und der Rest nochmals mit 40 ml auf 68 ° C vorgewärmten

* Der Firma Höchst AG., Frankfurt/Main-Höchst, danke ich für Überlassung der Farbstoffe.

Aqua dest. geschüttelt worden. Nach erneutem Zentrifugieren waren 3 Phasen vorhanden. Die obere wäßrige Phase, in der sich beim Wärmeauszug nach WESTPHAL die Polysaccharide und Nucleinsäuren befinden, wurde in Dialysierschläuche gegen Carbowax auf ca. $1/4$ des Ausgangsvolumens eingeengt. Das Konzentrat wurde im 6-fachen Volumen 98%igen Aethanols unter Zusatz von Natriumacetat aufgenommen, wobei die Polysaccharide ausfielen. Die Fällung wurde abzentrifugiert, dreimal mit 98%igem Aethanol gewaschen und dann in 0,85%iger NaCl-Lösung gelöst. Geringe Spuren eines unlöslichen Rückstandes sind abzentrifugiert worden. Die Phenolphase und der abzentrifugierte unlösliche Rückstand wurden verworfen.

4. Die Hydrolyse der Polysaccharide:

Die Polysaccharide von *Candida albicans* und *Candida tropicalis* (je 10 mg) wurden nach einer Methode von SUMMERS (25) mit 1 ml $2n$ H_2SO_4 2 Std. im Bombenrohr bei $100^\circ C$ hydrolysiert. Anschließend ist das Hydrolysat mit $Ba(OH)_2$ auf pH 6 gebracht und zentrifugiert, sowie der Überstand abgehoben worden. Das entstandene $BaSO_4$ wurde zweimal mit Wasser gewaschen, und das Waschwasser nach erneuter Zentrifugation mit dem Überstand vereinigt. Nach Einengung der so gewonnenen Lösung im Rotationsverdampfer bis zur Trockne ist die getrocknete Substanz in Pyridin gelöst worden. Die Lösung wurde scharf zentrifugiert, der Überstand abgehoben und zur Entfernung möglicherweise noch vorhandener Verunreinigungen durch die Hydrolyse über Aktivkohle filtriert.

5. Dünnschichtchromatographie:

Die Dünnschichtchromatographie wurde nach der von STAHL (24) angegebenen Methode durchgeführt. Zur Beschichtung der Platten diente "Kieselgur G - Merck".

30 g "Kieselgur G" wurden mit 60 ml einer 0,02 m wäßrigen Natriumacetatlösung angerührt und mit der von STAHL entwickelten Apparatur auf 200 x 200 mm Glasplatten in einer Schichtdicke von 0,25 mm aufgetragen. Die beschichteten Platten sind dann 15 Min. bei Raumtemperatur und anschließend 30 Min. bei $100^\circ C$ getrocknet worden. Nach Abkühlen der Platten erfolgte die Auftragung der zu prüfenden Substanz mit einer Blutzuckerpipette, wobei der Startfleck ständig einem Warmluftström durch einen Handföhn ausgesetzt wurde. Der Durchmesser des

Startflecks blieb damit auf 3 - 5 mm beschränkt, obwohl eine genügend große Menge aufgetragen werden konnte.

Die Elution wurde in einer Trogkammer mit Kammerübersättigung nach dem Prinzip der aufsteigenden Chromatographie durchgeführt. Die Kammerübersättigung erreicht man dadurch, daß man die Kammerwände möglichst lückenlos mit Filterpapier ausschlägt, und die mit dem Laufmittel gefüllte Kammer nach jeder Wandseite soweit kippt, daß sich das Filterpapier vollständig mit dem Laufmittel vollsaugen kann. Die so präparierte Kammer blieb mindestens 30 Min. lang stehen, bevor sie zur Chromatographie verwandt wurde, damit eine vollständige Sättigung der Kammeratmosphäre gewährleistet war.

Die Kieselgurschicht wurde gleichmäßig mit einem frisch 1 : 1 angesetzten Gemisch aus 20%iger H_2SO_4 und 0,2%iger alkoholischer Naphthoresorcin-Lösung besprüht. Waren die Farbflecke nach Trocknung der Platte (10 - 15 Min. bei 100 - 105 ° C) nur schwach sichtbar, wurde sie in heißem Zustand nochmals besprüht, so daß die charakteristischen Farben deutlich hervortraten.

6. Seroreaktionen:

a) Komplementbindungsreaktion

Nach Auswertung der Antigene mit Vergleichsseren von bekanntem Titer kamen 2 Antigeneinheiten zur Anwendung; ferner wurden 1 1/2 Komplementeinheiten in das Reaktionsgemisch eingebracht. Nach Wärmebindung von Serumverdünnung, Komplement und Antigen (1 Std. bei 37 ° C) im Wasserbad kam das hämolytische System hinzu. Die Ablesung erfolgte 15 Min. später. Als positiv galt mindestens 50%ige Hämolysehemmung.

b) Präzipitation

In Anlehnung an SEELIGER (21) und OTTO (18) ist die Präzipitation im Agar-Gel-Diffusionstest nach OUCHTARLONY (1 1/2%iger Wasseragar) durchgeführt worden. Als positiv beurteilt wurde deutliche Streifenbildung zwischen den peripheren und der zentralen Grube nach zehntägiger Aufbewahrung (24 Std. bei 30 ° C, danach im Kühlschrank).

C. Ergebnisse

1. Nachweis der Polysaccharide mittels Dünnschichtchromatographie

Zur Ausarbeitung der günstigsten Methode zur Chromatographie der aus der Hydrolyse gewonnenen Monosaccharide diente ein Gemisch aus drei Modellsubstanzen, nämlich Glucose, Mannose und Xylose. Diese Monosaccharide wurden zunächst sowohl in Wasser als auch in Pyridin gelöst. Dabei zeigte sich, daß die Lösung in Pyridin drei Vorteile aufweist:

- a) Die Substanzen bilden auch nach einer Wanderung von 10 cm Laufstrecke gleichmäßig runde Flecken, wohingegen sie bei Lösung in H_2O nach dieser Strecke breit auslaufen, so daß die Ermittlung des R_f -Wertes zu ungenau wird.
- b) Die in Pyridin gelösten Substanzen gewährleisteten ein sauberes Auftragen, da die Startflecke bei diesem leichtflüchtigen Lösungsmittel klein gehalten werden können, während bei Lösung in H_2O die Gefahr besteht, daß die Flecke schon beim Auftragen zu breit auseinanderlaufen.
- c) Die bei der Neutralisation des Hydrolysates entstandenen Salze lösen sich nicht in Pyridin und können von den gelösten Zuckern durch Zentrifugation abgetrennt werden. Dadurch wird eine Schwanzbildung, die auf einem Salzeffekt beruht, bei den gewanderten Substanzen vermieden.

Es wurde deshalb bei weiteren Versuchen nur noch Pyridin als Lösungsmittel verwandt.

Als Elutionsmittel auf Kieselgur-C-Schichten bewährte sich nach Angaben von STAHL (24) ein Gemisch aus Essigsäureäthylester und Isopropanol mit Wasser. Durch Erhöhung des Isopropanol-Wasseranteils läßt sich die Laufgeschwindigkeit steigern, und die R_f -Werte werden größer. Bei Di- und Trisacchariden wurden dadurch eine bessere Auftrennung erreicht, jedoch nicht bei Monosacchariden mit einander ähnlichen R_f -Werten. Nach Versuchen mit verschiedenen hohen Isopropanol-Wasseranteilen bewährte sich am besten ein Gemisch aus 65 ml Essigsäureäthylester und 35 ml Isopropanol : Wasser (2 : 1).

Die Monosaccharide zeigten nach einmaligem Lauf bei niedrigen R_f -Werten einen Ansatz zur Trennung. Nach Abdampfen des Fließmittels wurde das Chromatogramm nochmals mit demselben Laufmittel eluiert. Nach dreimaligem Lauf war eine saubere Trennung des Monosaccharidgemisches erreicht worden.

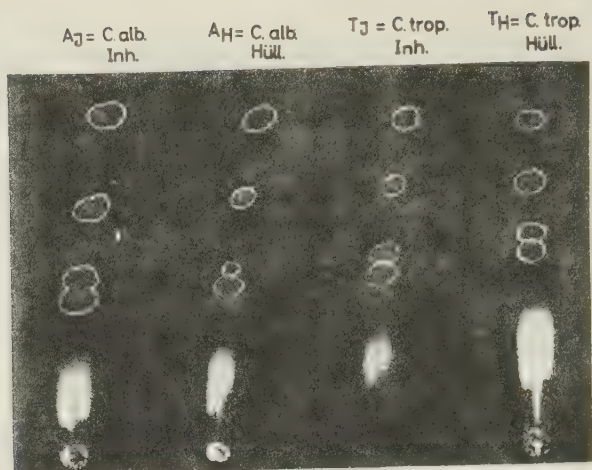


Abb. 1 Dünnschichtchromatogramm nach einmaligem Lauf.
Elutionsmittel: Gemisch aus Essigsäureäthylester
und Isopropanol mit Wasser.

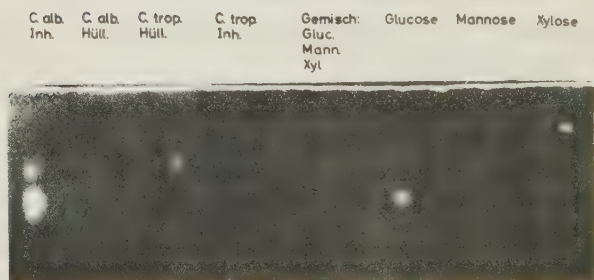


Abb. 2 Dünnschichtchromatogramm nach dreimaligem Lauf
im Vergleich mit Referenzzuckern.
Elutionsmittel: Gemisch aus Essigsäureäthylester
und Isopropanol mit Wasser.

Das serologisch aktive Material wurde nach Hydrolyse unter den gleichen methodischen Bedingungen chromatographiert. Als Testsubstanzen dienten Glucose, Mannose, Xylose, Ribose und Arabinose. Nach einmaligem Lauf hatten sich schon Substanzen aus dem Gemisch getrennt (s. Abb. 1). Der große längliche Fleck, der direkt über dem Startfleck liegegeblieben war, konnte nach dreimaligem Lauf in 2 weitere Flecke getrennt werden (s. Abb. 2). Während die nach einmaligem Lauf dargestellten Flecken mit ihren relativ hohen Rf-Werten noch nicht identifiziert werden konnten, deuteten die Rf-Werte und die Farbe der nach dreimaligem Lauf getrennten Flecken darauf hin, daß es sich um Glucose und Mannose handelt, welche genau die gleichen Rf-Werte und dieselben Farben aufweisen. Demnach ist es durchaus wahrscheinlich, daß die serologisch aktiven Polysaccharide aus 6 Zuckerbausteinen zusammengesetzt sind.

2. Auswahl der Farbstoffe am Modell

Zur Markierung der Polysaccharide wurde ein Farbstoff gesucht, der im Verlauf ihrer chromatographischen Auftrennung auch bei starker Verdünnung noch gut erkennbar sein sollte. Auf Grund dieser Überlegungen, im übrigen aber vollkommen willkürlich, wurden aus mehreren Präparaten die Farbstoffe Remazoltürkisblau G und Remazolrot B ausgewählt und miteinander verglichen.

Remazoltürkisblau G war bei einer Konzentration von 1 Gamma/ml mit bloßem Auge noch gut sichtbar. Remazolrot B erst von 10 Gamma/ml an.

Zur Markierung der Polysaccharide wurde deshalb meistens Remazoltürkisblau G verwandt.

Zur schonenden Behandlung der Antigene wurde versucht, die Bedingungen der Kalt-Färbeverfahren (30) (Temperaturbereich zwischen 10 - 50 ° C) auf die Polysaccharide von *C. albicans* und *tropicalis* anzuwenden. Die Färbedauer wurde abhängig von der Temperatur von 30 Min. bis zu 72 Stunden variiert. Als günstigster Temperaturbereich erwiesen sich Temperaturen zwischen 20 und 30 ° C. Die zum Anfärben verwandte Farbstofflösung enthielt jeweils 50 mg Farbstoff/ml. Zur Auslösung der Färbereaktion eignete sich eine alkalische Lösung, die 0,1 % NaOH und 20 % NaCl enthielt.

Wurde die Färbung bei Zimmertemperatur (22°C) durchgeführt, so ließ sich die Farbstofffixierung nach 24-stündiger Färbedauer durch Verlängerung der Reaktionszeit nicht mehr erhöhen.

3. Bedingungen der Farbstoffmarkierung von Polysacchariden am Modell der Stärke

Zur Ermittlung milder Färbebedingungen ist als Modellpolysaccharid Stärke* gewählt worden. Bei einer Stärkekonzentration von 1 mg/ml wurden die Färbedauer, die Farbstoffkonzentration, der pH-Wert, die Temperatur sowie der Elektrolytgehalt entsprechend variiert (s. Tab. 1 - 3) und zwei verschiedene Verfahren des Anfärbens erprobt:

- I. Die Polysaccharidlösung und die Farbstofflösung wurden gemischt, im Rotationsverdampfer bei 40°C bis zur Trockne eingengt, und danach erst mit alkalischer Lösung versetzt (s. Tab. 1).
- II. Die Polysaccharid-, Farbstoff- und alkalische Lösung sind sofort gemischt worden (s. Tab. 2 und 3). Wie zu erwarten, färbte sich das Polysaccharid unter gleichen Bedingungen der Färbedauer, der Farbstoffkonzentration, des pH-Wertes, der Temperatur und des Elektrolytgehaltes nach dem 1. Verfahren intensiver.

Nach Ablauf der Färbezeit wurde der Ansatz mit 0,5n HCl neutralisiert und damit der Färbevorgang unterbrochen. Trübungen, die sich nach der Färbung bildeten, wurden abzentrifugiert. Der Überstand, d. h. das gefärbte Polysaccharid, ist dann durch Säulenchromatographie an Sephadex G 25 vom überschüssigen Farbstoff durch Elution mit H_2O getrennt worden. Das so gewonnene, markierte Polysaccharid wurde anschließend nochmals chromatographiert, um möglicherweise noch vorhandene Reste überschüssigen Farbstoffs zu entfernen.

Stärke ließ sich nur in der gefärbten, vorauslaufenden Fraktion nachweisen, während der in größerem Abstand nachfolgende, abgetrennte Farbstoffüberschuß kein Polysaccharid enthielt.

* Amylum solubile, Firma Merck, Darmstadt.

An Hand einer Eichkurve, die mit dem Spektralphotometer PMQ II von C. Zeiss gemessen wurde, konnte die Konzentration des Farbstoffes in der Probe ermittelt werden. Zur Messung wurde für Türkisblau G das Absorptionsmaximum bei 665 m μ , für Remazolrot B bei 510 m μ herangezogen.

Tabelle 1

Färbung mit Remazoltürkisblau G nach Färbeverfahren I

Von 10 mg Stärke (Lösung 1 mg/ml) fixierte Farb- stoffmenge (µg)	Alkalische Lsg. *)		Temperatur in ° C	Dauer in h	Zur Färbung verwendete Farbstofflsg. (50 mg/ml) in 0,1 ml
	% NaOH	% NaCl			
6,8	0,1	20	22	24	1
4,8	0,1	20	22	8	1
4,8	0,1	20	22	72	1
3,7	0,1	20	22	3	1
2,5	0,1	20	20	4	1
1,8	0,1	20	20	2	1
1,5	0,1	20	20	2	1
4,1	0,1	20	30	2	1
3,4	0,1	20	30	2	5
3,0	0,1	gesättigt	30	2	5
1,9	0,1	20	30	2	0,5
./.	0,1	20	30	2	0,2
1,4	0,45	20	30	1	5
3,2	0,1	20	40	1	5
2,5	0,2	20	40	1	5
1,85	0,9	20	40	1	5
3,0	0,3	20	50	1	5
3,6	0,1	20	60	0,5	5
3,3	0,1	gesättigt	60	0,5	5

*)

Es wurden jeweils 5 ml der alkalischen Salzlösung zur Auslösung der Farbreaktion der Polysaccharid-Farbstofflösung zugesetzt.

Tabelle 2

Färbung mit Remazoltürkisblau G nach Färbeverfahren II

Von 10 mg Stärke (Lösung: 1 mg/ml) fixierte Farb- stoffmenge (µg)	Alkalische Lsg. *)		Temperatur in ° C	Dauer in h	Zur Färbung verwendete Farbstofflg. (50 mg/ml) in 0,1 ml
	% NaOH	% NaCl			
3,0	0,1	20	3	72	5
4,2	0,3	20	22	24	3
3,2	0,1	20	22	24	3
4,8	0,1	20	30	5	5
2,0	0,3	20	30	2	3
2,0	0,9	20	30	2	3
1,6	0,1	20	30	5	5
1,4	0,1	20	30	4	3
0,85	0,15	20	30	1	5
1,9	0,1	20	40	2	5
1,85	0,3	20	40	1	5
1,1	0,1	20	40	2	1
1,1	0,07	20	40	1	5
1,0	0,1	gesättigt	40	2	6
0,85	0,035	20	40	1	5
3,1	0,1	20	50	1	5
1,1	0,05	20	50	1	5
1,4	0,1	20	60	0,5	5

*)

Es wurden jeweils 5 ml der alkalischen Salzlösung zur Auslösung der Farbreaktion der Polysaccharid-Farbstofflösung zugesetzt.

Tabelle 3

Färbung mit Remazolrot B nach Färbeverfahren II

Von 10 mg Stärke (Lösung: 1 mg/ml) fixierte Farb- stoffmenge (µg)	Alkalische Lsg. *)		Temperatur in ° C	Dauer in h	Zur Färbung verwendete Farbstofflg. (50 mg/ml) in 0,1 ml
	% NaOH	% NaCl			
50,0	0,1	20	3	72	5
45,0	0,1	20	22	24	5
28,5	0,1	20	30	5	5

Nach Färbeverfahren I

47,5	0,1	20	22	72	1
38,5	0,1	20	22	24	1

*)

Es wurden jeweils 5 ml der alkalischen Salzlösung zur Auslösung der Farbreaktion der Polysaccharid-Farbstofflösung zugesetzt.

4. Serologische Versuche mit markierten Polysacchariden

Die an Stärke entwickelten Färbbedingungen wurden auf die durch Phenolextraktion gewonnenen, serologisch aktiven Polysaccharide von *C. albicans* und *C. tropicalis* übertragen.

Nachdem die Markierung der Polysaccharide mit Remazolfärbstoffen gelungen war, mußte die Frage geklärt werden, ob die serologische Aktivität durch den Färbeprozess beeinflußt wird. Deshalb wurde die serologische Aktivität vor und nach der Markierung geprüft.

a) Präzipitationsversuche:

Die durch Wasser:Phenol-Extraktion gewonnenen serologisch aktiven Polysaccharide aus dem Zellinhalt von *C. albicans* und *C. tropicalis* wurden nach den Färbverfahren I und II mit Remazoltürkisblau G und Remazolrot B markiert. Die gefärbten und ungefärbten Haptene der gleichen Charge werden im Präzipitationstest nach OUCHTERLONY mit den homologen Antiseren zur Reaktion gebracht.

Gleichzeitig ist geprüft worden, ob die beiden verwendeten Farbstoffe oder die gefärbte Stärke mit den Antiseren eine Verbindung eingehen, die spezifische Präzipitationslinien vortäuschen können.

Aus Abb. 3 geht hervor, daß weder die Farbstoffe noch ihre Verbindungen mit Stärke Linien hervorrufen, während sowohl die ungefärbten als auch die gefärbten Polysaccharide aus dem Zellinhalt beider Hefen mit dem Antiserum Präzipitationsbanden bilden.

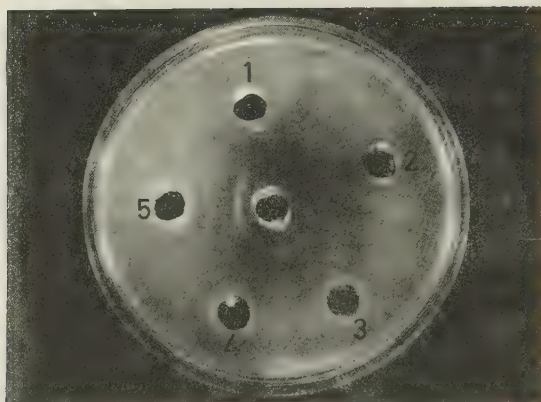


Abb. 3 Agar-Gel-Diffusionstest nach OUCHTERLONY
1 Remazoltürkisblau G
2 Remazolrot B
3 mit Remazoltürkisblau G gefärbtes Antigen
4 mit Remazolrot B gefärbtes Antigen
5 ungefärbtes Antigen

Um festzustellen, ob durch die Markierung mit den Farbstoffen möglicherweise ein Antigenverlust auftritt, wurde von den aktiven Substanzen - gefärbt und ungefärbt - eine Verdünnungsreihe (Faktor 2) hergestellt und jede Verdünnung mit demselben Antiserum im Präzipitationstest zur Reaktion gebracht. Alle Substanzen, gefärbt oder ungefärbt, reagierten bei einer Verdünnung von 1 : 16 mit deutlichen Präzipitationslinien. Nach Einstellung der Antigengebrauchsverdünnung wurden die ungefärbten und gefärbten Polysaccharide aus den Zellinhalten von *C. albicans* und *C. tropicalis* mit je einer Verdünnungsreihe eines *C. albicans*- bzw. *C. tropicalis*-Antiserums im Agar-Gel zur Reaktion gebracht. Dabei ergab sich, daß die Antigene, ob gefärbt oder ungefärbt, mit demselben Antiserum Präzipitationslinien in gleichen Serumverdünnungen hervorriefen.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß durch die Farbstoffmarkierung die serologische Aktivität nicht beeinflusst wird.

b) Komplementbindungsreaktion:

Die Prüfung der markierten Antigene erfolgte ferner mit der Komplementbindungsreaktion.

Zunächst wurde die Gebrauchsverdünnung der Antigene (2 E.) an einem bekannten Antiserum ermittelt. Dabei ergab sich, daß sowohl die ungefärbten als auch die gefärbten Antigene in einer Verdünnung von 1 : 200 zu verwenden waren. Durch die Anfärbung der Antigene trat also auch hier kein Antigenverlust auf.

Mit den serologisch aktiven Polysacchariden aus *Candida albicans* und *Candida tropicalis* wurden mehrere C. albicans- und C. tropicalis-Antisera im Komplementbindungsversuch verglichen. Die Seren zeigten mit den ungefärbten und den gefärbten Substanzen gleich hohe Titer. Das besagt, daß auch qualitativ das Bindungsvermögen der Antigene durch die Anfärbung nicht beeinträchtigt wird.

Während sich die bisherigen Versuche auf Antigene aus dem Zellinhalt bezogen, wurde entsprechend auch die Antigenaktivität aus der Zellwand untersucht. Da sie nur schwer präzipitierbar ist, erfolgte die Untersuchung des durch Phenol/Wasser-Extraktion gewonnenen Hüllenantigens nach Anfärbung nur mit der Komplementbindungsreaktion allein. Auf die Präzipitationsreaktion konnte verzichtet werden, weil ihre Ergebnisse in den vorausgegangenen Untersuchungen mit den Werten der Komplementbindungsreaktion identisch waren.

Es zeigte sich, daß auch das gefärbte Hüllenantigen im Vergleich zu dem ungefärbten weder qualitativ noch quantitativ einen Aktivitätsverlust erlitt.

D. Besprechung

Nach Angaben zahlreicher Autoren (22, 29, 20, 28, 13, 25, 17, 2, 10, 12) handelt es sich bei den serologisch aktiven Substanzen in Hefen um Polysaccharide, die sich aus Glucose und Mannose zusammensetzen (22, 26, 25, 2, 10, 12). Eigene Versuche ergaben, daß sich die durch Phenolextraktion gewonnenen Polysaccharide, unter denen sich auch die serologisch aktiven Substanzen befanden, in sechs Zucker oder zuckerähnliche Stoffe durch Säurehydrolyse und anschließende Dünnschichtchromatographie zerlegen ließen. Bei zwei Zuckern deutet die Übereinstimmung in Rf-Werten und Farbreaktionen mit Referenzzuckern darauf hin, daß es sich um Glucose und Mannose handelt, während die vier übrigen Zucker noch nicht identifiziert werden konnten. Die von anderen Autoren abweichenden Ergebnisse dürften ihre Ursache in den verschiedenen Methoden haben.

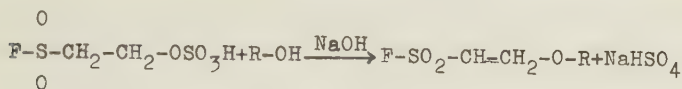
Es wurde nach Verfahren gesucht, diese Polysaccharide zu markieren. Als reagierende Gruppen kommen bei den Polysacchariden nur die Hydroxylgruppen in Frage, da freie Aldehydgruppen kaum vorliegen.

Es ist bei einer Markierung von vornherein damit zu rechnen, daß sich die primären und sekundären Hydroxylgruppen in ihrer Reaktionsfreudigkeit unterscheiden werden. Grundsätzlich kommen folgende Reaktionen in Frage:

1. die Umsetzung der OH-Gruppen der Polysaccharide unter Veresterung z.B. durch Tosylierung (9),
2. die Umsetzung mit Isocyanaten und Isothiocyanaten (8, 9),
3. die Verätherung z.B. durch Tritylierung oder Umsetzung mit Vinylderivaten (7, 3).

Grundsätzlich könnten alle Reaktionspartner der Polysaccharide mit einem Farbstoffmolekül verknüpft werden, jedoch sind von den aufgezählten Reaktionen nur diejenigen geeignet, die unter günstigen Bedingungen stattfinden. Diesen Vorzug besitzt der Umsatz mit reaktiven Vinylgruppen bzw. substituierten β -Hydroxy-äthylsulfonsäureestern, da die anderen Reaktionen bei einer Temperatur von 70 - 90 ° C in Pyridin stattfinden, die Vinylierung jedoch bei niedriger Temperatur und einem pH-Wert zwischen 10 - 11 möglich ist.

Nach von der ELTZ und WAGNER (30) reagieren Remazolfarbstoffe mit Polysacchariden folgendermaßen:



β-hydroxy-äthylsulfonschwefelsäureester

F = Vinylsulfonfarbstoff

R-OH = Polysaccharid

Weiterhin erwies sich vorteilhaft, die bereits im Handel befindlichen Vinylderivate zu verwenden, weil der Nachweis, daß sie mit Polysacchariden bzw. Cellulose eine chemische Verbindung eingehen, schon erbracht worden ist.

Wie die Versuche am Stärkemodell zeigten, lassen sich Polysaccharide mit den Vinylsulfonfarbstoffen anfärben. Da diese Markierung aber auch auf serologisch aktive Polysaccharide ausgedehnt werden sollte, war von vornherein zu berücksichtigen, daß weder die Temperatur und der pH-Wert, bei welchen die Markierung mit den Farbstoffen durchgeführt wurde, noch die Anlagerung des Farbstoffes die serologische Aktivität beeinflussen. Die Temperatur und der pH-Wert wurden deshalb so ausgewählt, daß sie die serologische Aktivität möglichst nicht schädigen. Der Einbau des Vinylsulfonfarbstoffmoleküls findet nach BOHNERT (3) bei einer Zellulosefärbung etwa bei jedem 400. Polysaccharidbaustein statt. Es war deshalb zu erwarten, daß die serologische Aktivität kaum beeinflusst wird. Tatsächlich zeigen die Versuchsergebnisse mit der Komplementbindungsreaktion und mit dem Agar-Gel-Präzipitationstest, daß die Markierung der serologisch aktiven Polysaccharide mit den Farbstoffen keinen Aktivitätsverlust zur Folge hatte.

Es wurde also gezeigt, daß sich die Polysaccharide mit Haptencharakter durch Vinylsulfonfarbstoffe markieren lassen, ohne daß ein Aktivitätsverlust eintritt. Dadurch wird die Auffindung serologisch aktiver Polysaccharidfraktionen in der Säulenchromatographie wesentlich erleichtert.

E. Zusammenfassung

Die Anwendung verschiedener serologischer Methoden bei Antigenuntersuchungen an den Hefen *C. albicans* und *C. tropicalis* führte zu unterschiedlichen Befunden. Chemische Analysen mehrerer Autoren ergaben, daß es sich bei den Hefeantigenen hauptsächlich um Polysaccharide handelt! Es wurden deshalb die Polysaccharide aus den beiden Hefen nach der Methode von WESTPHAL gewonnen und nach Säurehydrolyse in der Dünnschichtchromatographie mit Referenzzuckern verglichen. Dieses Verfahren führte zur Erkennung von Glucose und Mannose, sowie zur Darstellung von drei weiteren Zuckern, die noch nicht identifiziert werden konnten. Die Isolierung der einzelnen Polysaccharidantigene, die den Antigenaufbau der Hefen endgültig klären könnte, ist bisher nicht gelungen, vermutlich, weil die Polysaccharide bei den chromatographischen Trennungsverfahren schwer auffindbar sind. Es wurde deshalb nach einer schonenden Markierung für Polysaccharide gesucht. Hierfür erwiesen sich die Vinylsulfonfarbstoffe Remazolrot B und Remazoltürkisblau G als geeignet. Für beide Substanzen wurden die günstigsten Färbbedingungen ermittelt.

Die Prüfung der mit Reaktivfarbstoffen markierten serologisch aktiven Polysaccharide im Agar-Gel-Präzipitationstest und in der Komplementbindungsreaktion ergab, daß dadurch ihre Antigenität nicht beeinträchtigt wurde.

Die Möglichkeit, Polysaccharidantigene zu markieren, bedeutet eine wesentliche Erleichterung für die Isolierung der einzelnen Antigene.

F. Literaturverzeichnis

- 1) ALMON, L. and W.D. STOVALL: Serologic reactions of cultures of *Monilia* and of some other yeastlike fungi
J. Inf. Dis. 55 (1934), 12 - 25.
- 2) BISHOP, C.T., F. BLANK and R.E. GARDNER: The cell wall polysaccharides of *Candida albicans*: Glucan, Mannan and Chitin
Canad. J. chem. 38 (1960), 869 - 875.
- 3) BOHNERT, E.: Experimenteller Nachweis der Bindung von Vinylsulfon-Farbstoffen an die Zellulosefaser
Melliand Textilberichte 42 (1961), 1156 - 1160.
- 4) BOIVIN, A. et L. MESROBEANU: Remarques concernant la technique d'extraction du complexe polysaccharidique antigénique renfermés dans le Bacille d'Aertrycke
Compt. rend soc. biol. 115 (1934), 304 - 310.
- 5) BÜRGER, H. und H.-L. MÜLLER: Markierung von antigenen Polysacchariden mit Vinylsulfon-Farbstoffen
Z. Naturwissensch. 19 (1964), 463.
- 6) FULLER, A.T.: The formamide method for the extraction of polysaccharides from haemolytic streptococci
Brit. Exper. Path. 19 (1938), 130 - 139.
- 7) HEYNA, J.: Reaktivfarbstoffe mit Vinylsulfongruppen
Angew. Chemie 74 (1962), 966 - 969.
- 8) HUSEMANN, E., R. RESZ und R. WERNER: Über die natürliche und synthetische Amylose
Makromolekulare Chemie 47 (1961), 48 - 71.
- 9) HUSEMANN, E. und R. RESZ: Über die natürliche und synthetische Amylose
Makromolekulare Chemie 48 (1961), 171 - 192.
- 10) JONSEN, J.: Serologic studies in genus *Candida*
Thesis Oslo 1955
- 11) KEMP, G. and H. SOLOTOROVSKY: Fluorescent antibody studies of pathogenesis in experimental *Candida albicans* infections of mice
J. Immunol. 88 (1962), 777 - 781.
- 12) KESSLER, G. and W.J. NIKERSON: Glucomannan-protein complexes from cell wall of yeasts
J. Biol. Chem. 9 (1959); 234, 2281 - 2283.
- 13) MANKOWSKI, Z.Th., Y. JAMASHITA and G. DILLER: Effect of *Candida guilliermondi* polysaccharide on transplantable mouse sarcoma 37.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96 (1957), 79 - 80.
- 14) MARKOWITZ, A.S. and J.R. HENDERSON: A rapid and specific method for the isolation of pneumococcal polysaccharide
Nature 181 (1958), 771 - 772.
- 15) MARTIN, D.S., C.P. JONES, K.F. YAO and L.E. LEE: A practical classification of the *Monilias*
J. Bact. 34 (1937), 99 - 123.

- 16) MARTIN, D.S.: Studies on the immunologic relationships among various species of the *Candida* (*Monilia*)
Amer.J.Trop.Med. 22 (1942), 295 - 307.
- 17) MIKULASZEK, E.: A method for the quantitative determination of precipitate constituents in precipitating polysaccharide systems
Bull.Acad.Polonaise Sci. 3 (1955), 21 - 25.
- 18) OTTO, R.: Experimentelle Untersuchungen über die Streptokokkenpräzipitation im Agar-Gel
Zbl. Bakt. I Orig. 177 (1960), 546 - 552.
- 19) POSPISIL, I.: Zur Serologie der mykotischen Erkrankungen
Zbl. Bakt. I Orig. 163 (1955), 407 - 409.
- 20) RZUCIDLO, L., D. WEYMAN, A. STACHOW and C. RZESA:
Med. dōsw.mikrobiol. 7 (1955), 315 (Zit. nach 25).
- 21) SEELIGER, H.P.R.: Zur Anwendungsmöglichkeit der Präzipitation im Agar-Gel bei der O-Antigenanalyse von Bakterien und Pilzen
Z. Hyg. 141 (1955), 110 - 121.
- 22) SEELIGER, H.P.R.: Mykologische Serodiagnostik
Johann-Ambrosius-Barth-Verlag Leipzig (1958).
- 23) SIEGERT, R., H.-L. MÜLLER und D. PACHALY: Zur Antigenstruktur von *Candida albicans* und *Candida tropicalis* (1.Mittlg.)
Zbl. Bakt. I Orig. 191 (1964), 533 - 542.
- 24) STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie
(Ein Laboratoriumsbuch)
Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962).
- 25) SUMMERS, D.F., A.P. GROLLMANN and H.F. HASENCLEVER:
Polysaccharide antigens of *candida* cell wall
J. Immunol. 39 (1964), 491 - 499.
- 26) TSUCHIYA, T., F. MIASAKI and J. FUKAZAWA:
Jap.J.Exp.Med. 24 (1954), 95 - 103 (Zit. nach 27).
- 27) TSUCHIYA, T., Y. FUKAZAWA, S. KAWAKITA and F. MIYASAKI:
Studies on the classification of the genus *Candida* III
Jap.J.Exp.Med. 25 (1955), 75 - 83.
- 28) TUNG, T. and C. Sam WONG: Sensitizing capacity of polysaccharide of *monilia tropicalis*
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 41 (1939), 155 - 157.
- 29) VOGEL, A.R.: The polysaccharids of *Candida albicans*
Exp.Biol.Proc. 86 (1954), 373 - 375.
- 30) ELTZ, H.W. von der und K. WAGNER: Das Einbad-Klotz-Aufdeck-Verfahren für Remazolfarbstoffe
S.V.F.-Fachorgan 16 (1961), 320 - 340.
- 31) WESTPHAL, O., O. LÜDERITZ und F. BISTER: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser
Z. Naturforsch. 7b (1952), 148 - 155.

Herrn Professor Dr. med. R. Siegert, Direktor des
Hygiene-Institutes der Universität Marburg / Lahn,
danke ich für die Überlassung des Themas und Arbeits-
platzes sowie für die uneingeschränkte Unterstützung
und Förderung meiner Arbeit.

Gleichfalls bin ich Frau Dr. med. H.-L. Müller und
Herrn Dr. med. H. Bürger, Dipl.-Chemiker, wegen ihrer
ständigen Hilfsbereitschaft und freundlichen Beratung
bei der Durchführung der Versuche zu herzlichem Dank
verpflichtet.

Lebenslauf

Als Sohn des Chemikers Dr. Max Zabel und seiner Ehefrau Hiltrud, geb. Hagemeyer, wurde ich, Hans-Jürgen Zabel, am 30. 4. 1937 als viertes von sechs Kindern in Dessau geboren.

Am 28. Februar 1959 legte ich am Realgymnasium in Hünfeld/Hessen die Reifeprüfung ab und immatrikulierte mich im Sommer-Semester 1959 an der Universität Tübingen. Nach dem Sommer-Semester 1960 bestand ich in Tübingen das Vorphysikum. Zum Sommer-Semester 1961 bezog ich die Universität Mainz, wo ich nach dem Winter-Semester 1961/62 das Physikum bestand. Zum Winter-Semester 1962/63 immatrikulierte ich mich an der Universität Marburg/Lahn, wo ich die weiteren klinischen Semester verbrachte. Am 25. Oktober 1965 bestand ich das Medizinische Staatsexamen an der Universität Marburg/L.

Wohnungsanschrift: 355 Marbach/Marburg, Oberer Eichweg 21

Heimatanschrift: 6418 Hünfeld/Hessen, Bachstr. 6

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

in Tübingen: Barbey, Brecht, Bünning, Feneis, Krüger,
Möhres, Mörike, Müller, Rüdorff, Tonutti,
Weitzel;

in Mainz: Abel, Bredt, Kreienberg, Leicher, Matzker,
Oppel, Rohen, Schriever, Watzka;

in Marburg/L.: Braun-Falco, Exner, Gedigk, Hamm, Hartmann,
Heuser, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob,
Lang, Linneweh, du Mesnilde Rochemont,
Overbeck, Petry, Schadewaldt, Schleyer,
Schmidt, Schölmerich, Schwaiger, Siegert,
Siess, Straub, Streicher, Würterle.

